



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 100 25 145 A 1**

⑤ Int. Cl.⁷:
C 09 K 11/06
C 07 F 15/00
C 07 F 13/00
G 01 N 21/64
G 01 N 33/532

⑳ Aktenzeichen: 100 25 145.5
㉔ Anmeldetag: 20. 5. 2000
㉕ Offenlegungstag: 22. 11. 2001

DE 100 25 145 A 1

㉑ Anmelder:
PreSens Precision Sensing GmbH, 86633 Neuburg,
DE

㉒ Erfinder:
Klimant, Ingo Dr., 93051 Regensburg, DE

⑤⑥ Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
zu ziehende Druckschriften:

DE 198 29 657 A1
DE 195 19 973 A1
US 56 18 732
US 50 98 659
EP 04 38 882 A2
WO 99 37 998 A1

YANUCK, Michael D., et.al.: Effects of non-electrolyte polymers on photoinduced electron transfer reactions. Influence of aqueous poly (vinyl alcohol) on quenching of tetraanionic porphyrins by methylviologen, Chem. Phys. Lett. 1985, 122 (1-2), 133-8, zitiert als Chemical Abstract 1986, Vol.104, Nr. 59258j;
CALVERT, Jeffrey M., et.al.: Metallopolymer Photochemistry. Photophysical, Photochemical, and Photoelectrochemical Properties of (bpy)₂ Ru^{II} Sites Bound to Poly(4-vinylpyridine). In: J. Am. Chem. Soc. 1982, 104, 6620-6627;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

⑤4 Phosphoreszierende Polyelektrolytaggregate

⑤7 Das Patent beschreibt die Herstellung und Verwendung von phosphoreszierenden Polyelektrolytmolekülen (Polyelektrolytphosphore). Dazu werden phosphoreszierende Metall-Liganden-Komplexe (vorzugsweise Ruthenium(II)-komplexe mit Polypyridyl-Liganden) über elektrostatische und Van der Waals Wechselwirkungen in Polyelektrolytmoleküle eingeschlossen. Dabei entstehen Aggregate, die sich durch außergewöhnliche physikalische und photophysikalische Eigenschaften auszeichnen. Die wichtigste Eigenschaft dieser Aggregate besteht darin, daß der angeregte Zustand des phosphoreszierenden Metall-Liganden-Komplexes durch den umhüllenden Polyelektrolyten abgeschirmt wird. Damit hat die Anwesenheit typischer Phosphoreszenzlöcher wie molekularer Sauerstoff, Ascorbat oder Bisulfit keinen oder nur geringen Einfluß auf die Phosphoreszenzeigenschaften (Quantenausbeute und Lebenszeit). Im Vergleich zu kürzlich vorgestellten phosphoreszierenden Nano- und Mikropartikeln ist die Größe phosphoreszierender Polyelektrolyte wesentlich geringer. Die mittleren Molekülmassen liegen im Bereich von 20000 bis 1000000 je nach der Art des eingesetzten Polyelektrolyten. Damit sind sie neben Quantumdots und Phycobiliproteinkomplexen die kleinsten bekannten polymeren Lumineszenzmarker. Die typischen Lumineszenzabklingzeiten der phosphoreszierenden Polyelektrolyte liegen im Bereich von 500 Nanosekunden bis 6 Mikrosekunden. Die Polyelektrolytphosphore können vielfältige Anwendungen in der Bio- und Chemoanalytik ...

DE 100 25 145 A 1

BEST AVAILABLE COPY

Hintergrund der Erfindung

[0001] Die Messung der Lumineszenz ist eine weit verbreitete Methode in der Bio- und Chemoanalytik. Ihre Attraktivität verdankt sie ihrer hohen Empfindlichkeit, der Vielseitigkeit sowie der Eliminierung der Strahlenbelastung durch radioaktive Markierungsreagenzien. In der Praxis werden in der Regel Fluoreszenzmarker eingesetzt, die sich durch eine hohe Quantenausbeute auszeichnen eingesetzt. Meist wird die Korrelation zwischen Fluoreszenzintensitätssignal sowie der Konzentration des Fluoreszenzmarkers in der Probe als Meßparameter ausgewertet. Nachteilig wirkt sich bei solchen Messungen aus, daß die quantitative Auswertung der Fluoreszenzintensität durch eine Vielzahl von Faktoren gestört wird. Dabei kann es sich zum einen um Schwankungen der Intensität im optischen System (Lichtquelle, Detektor und optischer Weg), aber auch um intrinsische optische Eigenschaften der Probe handeln (Färbung, Trübung und Untergrundfluoreszenz) handeln. Um diese Störeinflüsse zu eliminieren, benötigt man effiziente Methoden zur Referenzierung der Fluoreszenzsignale. Eine kürzlich patentierte Methode zum Referenzieren von Fluoreszenzsignalen beruht darauf, daß zur Probe ein phosphoreszierender Referenzstandard zugegeben wird, der ähnliche (im besten Fall identische) spektrale Eigenschaften wie der eigentliche Fluoreszenzmarker aufweist (DE 198 29 657 A1). In Kombination mit einer Frequenzmodulations- oder zeitaufgelösten Lumineszenzmessung wird auf diese Weise die Intensitätsinformation in ein Phasensignal oder einen zeitabhängigen Parameter umgewandelt. Um auf diese Weise eine fehlerfreie Referenzierung des Meßsignals zu realisieren, werden inerte phosphoreszierende Referenzstandards benötigt, deren Phosphoreszenzeigenschaften von den Probenparametern nicht beeinflusst werden. Dafür kommen zum Beispiel phosphoreszierende anorganische Feststoffe wie zum Beispiel mit Cr(III) dotierte Mischoxide in Frage, die in gepulverter Form der Probe zugemischt werden können. Besser geeignet für diesen Zweck sind jedoch Phosphoreszenzfarbstoffe, die in organische und anorganische Trägermaterialien eingebaut werden und in Form von Mikro- oder Nanopartikeln der Probe zugemischt werden. Dabei kann es sich um lumineszierende Polypyridylkomplexe mit Ru(II), Os(II), Re(I), Pt(II) oder Ir(III) als Zentralatom, oder phosphoreszierende Porphyrine des Pt(II) oder Pd(II) oder Komplexe der Seltenen-Erdenmetalle wie Tb(III) oder Eu(III) handeln. Eine weitere weitverbreitete Methode in der Bioanalytik um lumineszenzmarkierte Moleküle sehr empfindlich und ohne Störung durch die Eigenfluoreszenz der Probe nachzuweisen, besteht darin, Lumineszenzfarbstoffe zum Markieren der Biomoleküle zu verwenden, die sich durch lange Abklingzeiten (im Bereich von 100 ns bis einige Millisekunden) auszeichnen. Solche Phosphoreszenzsignale lassen sich durch Zeit- oder phasenaufgelöste Messmethoden leicht vom Untergrundsignal abtrennen. Es können wiederum die oben beschriebenen Phosphoreszenzfarbstoffe zum Einsatz kommen.

[0002] Bei allen analytischen Anwendungen bei denen phosphoreszierende Moleküle eingesetzt werden, besteht das Problem, daß die Phosphoreszenzeigenschaften nicht nur vom nachzuweisenden Analyten, sondern von einer Vielzahl an weiteren Parametern des Mediums beeinflusst wird. Dies ist auf die lange Verweilzeit dieser Moleküle im angeregten Zustand zurückzuführen. Um die Vorteile von analytischen Phosphoreszenztests (extrem hohe Sensitivität) nutzen zu können, ist es notwendig, daß die photophysikalischen Eigenschaften des Phosphoreszenzfarbstoffs nicht

oder nur vernachlässigbar von der Zusammensetzung des Mediums abhängen. Werden solche Farbstoffe der Probe im gelösten Zustand zugegeben, sind diese Voraussetzungen nicht gegeben. Insbesondere Phosphoreszenzlöschung durch molekularen Sauerstoff sowie oxydative und reduktive Löcher bewirken Fehlinterpretationen des Meßsignals.

[0003] In einer kürzlich beschriebenen Erfindung werden phosphoreszierende Farbstoffe in hydrophobe Polymere eingebaut um sie vor dem störenden Einfluß des Mediums abzuschirmen (DE 199 33 104.9). Es wurden auf diese Weise Partikel mit Durchmessern im Bereich zwischen 50 Nanometern und wenigen Mikrometern hergestellt. Optimale Einbettungsmaterialien für die Phosphoreszenzfarbstoffe waren Polyacrylnitril oder Sol-Gele. Diese Materialien zeichnen sich insbesondere durch ihre geringe Permeabilität für Gase wie Sauerstoff und ionische Verbindungen aus. So war es möglich, den Löschefluß von molekularem Sauerstoff im Vergleich zu den gelösten Farbstoffen um einen Faktor von ca. 100 zu reduzieren. Partikel mit solchen kleinen Dimensionen haben weite Verbreitung in der Bioanalytik gefunden. Der Grund dafür liegt hauptsächlich in der Signalverstärkung wenn statt einzelner kovalent gebundener Fluoreszenzmoleküle ein lumineszierender Partikel mit einer Vielzahl an eingebauten Farbstoffmolekülen ein einzelnes Bindungsereignis anzeigt. Auf diese Weise läßt sich ein Verstärkungsfaktor des Lumineszenzintensitätssignals bis zu einem Faktor von 1000 zu erzielen.

[0004] Ein Problem der Anwendung von solchen Partikel zum Nachweis der Bindung von Biomolekülen besteht darin, daß sich bestimmte Eigenschaften des Biomoleküls nach Konjugation mit einem Partikel mit Dimensionen von 100 nm bis zu einigen Mikrometern deutlich verändern können. Dabei handelt es sich um solche wichtige Eigenschaften wie Mobilität (Diffusion), Rotation oder die Affinität zu entsprechenden Bindungspartnern. Desweiteren werden für Bindungsassays auf der Basis von strahlungslosen Energietransfer, bei denen ein ET-Partner in einem Partikel eingebaut vorliegt, sehr kleine Aggregate benötigt, da ansonsten die notwendige räumliche Nähe zwischen Donor und Akzeptor (im Bereich der sogenannten Försterdistanz) nicht gewährleistet ist. Auch für Lumineszenzassays zum Nachweis des Bindens von Proteinen auf der Basis von Lumineszenzdepolarisation werden sehr kleine (optimal im Größenbereich von Proteinen) Phosphoreszenzmarker benötigt.

Inhalt der Erfindung

[0005] Diese Erfindung beschreibt eine neue Art von Phosphoreszenzmarkern, die sich durch extrem kleine Dimensionen (von wenigen Nanometern) und hohe Phosphoreszenzhelligkeit auszeichnen. Dazu werden Phosphoreszenzfarbstoffe in Polyelektrolytmoleküle eingebaut.

[0006] Aufgrund der elektrostatischen Abstoßung zwischen den einzelnen gleichartig geladenen Polyelektrolytmolekülen erreicht man, daß die Größe der Farbstoff-Polyelektrolytaggregate im Bereich der Molekülgrößen des Polyelektrolyten liegen.

[0007] Auf diese Weise lassen sich extrem kleine phosphoreszierende Aggregate mit molaren Massen zwischen 10.000 g/mol bis zu mehreren Millionen g/mol auf einfache Weise gezielt herstellen. Es werden dazu nur Polyelektrolyte mit definierten Molekülmassen benötigt. Trotz der geringen Abmessungen wird der angeregte Zustand der eingebauten Phosphoreszenzfarbstoffe noch hinreichend effizient abgeschirmt. Eine Verringerung der Löschung durch molekularen Sauerstoff um einen Faktor von 20 ist auf diese Weise noch zu erzielen. Die auf diese Weise herstellbaren Aggregate sind wesentlich kleiner als Polymerpartikel, die mit

Emulsionspolymerisation oder Fällung hergestellt werden können. Durch gezielte Verwendung von Polyelektrolyten mit reaktiven Gruppen (Carboxy, Amino, Sulfo oder Epoxy) lassen sich diverse Biomoleküle wie Proteine, Viren, DNA- und RNA-Fragmente sowie Oligonukleotide an die phosphoreszierenden Polyelektrolytaggregate koppeln.

[0008] Die hier beschriebenen phosphoreszierenden Polyelektrolytaggregate lassen sich sehr einfach und reproduzierbar herstellen.

[0009] Aufgrund ihrer sehr geringen Größe können sie für viele Anwendungen eingesetzt werden. Sie eignen sich zum Beispiel für homogene oder heterogene Immunoassays auf der Basis von strahlungslosen Energietransfer, da ihre Abmessungen im Bereich des Försterradius liegen. Weitere Einsatzfelder ergeben sich als phosphoreszierende Referenzstandards, die zu Fluoreszenzassays oder Sensoren zugegeben werden und dann mit Hilfe von Zeit- oder phasen aufgelösten Meßtechniken die referenzierte Messung der Fluoreszenzintensität des Assays ermöglichen.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

[0010] Die in der Erfindung beschriebenen phosphoreszierenden Polyelektrolytaggregate sind in Abb. 1 dargestellt. Die Farbstoffmoleküle werden von dem polymeren Rückgrat des Polyelektrolyten umhüllt und damit vom umgebenden Medium abgeschirmt. Die Bindung des Farbstoffs an den Polyelektrolyten erfolgt vorzugsweise durch zwei verschiedene Wechselwirkungen.

1. elektrostatische Wechselwirkungen, wenn der Farbstoff entgegengesetzte Ladungen als der umhüllende Polyelektrolyt trägt.
2. Van-der Waals Wechselwirkungen zwischen hydrophoben Bereichen des eingebauten Farbstoffs und des polymeren Rückgrats des umhüllenden Polyelektrolyten.

[0011] Wenn beide Arten von Wechselwirkungen zwischen Farbstoff und Polyelektrolyt stark genug ausgeprägt sind, erfolgt keine Dissoziation des phosphoreszierenden Polyelektrolytaggregates.

[0012] Auch in Anwesenheit von hohen Konzentrationen an Fremdelektrolyten (z. B. Natriumchlorid oder Puffer-elektrolyte) sind die Aggregate noch stabil. Verdünnungsreihen, die bis zu einer Konzentration von 100 pM durchgeführt wurden, bewirken keine signifikante Veränderung der Phosphoreszenzeigenschaften der eingebauten Phosphoreszenzfarbstoffe. Das beweist die Stabilität der Aggregate.

[0013] Vorzugsweise werden Phosphoreszenzfarbstoffe eingebaut, die besonders starke Wechselwirkungen mit dem umhüllenden Polyelektrolytmolekül eingehen. Dabei handelt es sich vorzugsweise um Farbstoffe, die die entgegengesetzte Ladung zum Polyelektrolyten tragen, wenn möglich 2-fach oder 3-fach geladen sind, und zusätzlich hydrophobe Bereiche aufweisen. Werden die Ladungen dieser Farbstoffe mit lipophilen Gegenionen abgesättigt (wie Perchlorat oder Hexafluorophosphat) sollten sie völlig wasserunlöslich sein. Diese Eigenschaften treffen insbesondere auf phosphoreszierende Metall-Liganden Komplexe zu, die lipophile Liganden besitzen. Dabei handelt es sich vorzugsweise um Metall-Liganden-Komplexe mit Ruthenium(II), Osmium(II), Rhenium(I), Iridium(III) oder Pt(II) als Zentralatom. Bei den Liganden handelt es sich vorzugsweise um Polypyridylverbindungen mit hydrophoben Seitengruppen.

[0014] Die Moleküle des umhüllenden Polyelektrolyten sollten neben den geladenen Gruppen auch deutlich hydrophobe Bereiche aufweisen, da diese die abschirmende Wir-

kung der eingebauten Farbstoffe hauptsächlich bewirken. Bei den Polyelektrolyten kann es sich zum einen um Polymere der Gruppe der Homopolymere handeln, bei denen der Monomerbaustein Ladungen trägt und hydrophobe Bereiche aufweist. Ein besonders gut geeigneter Polyelektrolyt dieser Gruppe, der diese Eigenschaften ausweist ist die Polystyrensulfonsäure. Die phenolischen Styrenguppen bewirken starke Wechselwirkungen mit vielen Polypyridylliganden.

[0015] Es können aber Heteropolymere verwendet werden bei denen die geladenen Gruppen und die hydrophoben Bereiche von unterschiedlichen Monomerbausteinen herühren.

[0016] Die Effizienz der Abschirmung der Farbstoffe von den Bestandteilen des Mediums hängt aber nicht nur von der Struktur des Polyelektrolyten, sondern auch stark von dessen Molekülgröße ab. Je höher das Molekulargewicht des Polyelektrolyten ist, desto größere Aggregate bildet es mit dem Farbstoff, womit die abschirmende Wirkung verbessert wird. Da auf Grund hinreichend starker physikalischer Wechselwirkungen auf eine kovalente Verknüpfung des Phosphoreszenzfarbstoffes an das abschirmende Makromolekül verzichtet werden kann, ist die Herstellung dieser Aggregate sehr einfach. Es brauchen nur zwei Lösungen, von denen eine den Polyelektrolyten (wässriges System) und die andere den Farbstoff (entweder wässrige Lösung oder mit Wasser mischbare Lösung) gemischt werden. Auf diese Weise wird der Farbstoff vollständig in den Polyelektrolyten eingebaut. Damit ist es möglich die Farbstoffkonzentration definiert einzustellen. Es entstehen tief gefärbte vollständig klare Lösungen, die intensiv phosphoreszieren.

[0017] Wird das Mengenverhältnis Farbstoff zu Polyelektrolyt zu hoch gewählt – was im Interesse hoher Lumineszenzsignale wünschenswert ist und trägt der Farbstoff mehrere Ladungen können während der Herstellung große Aggregate ausfallen. Dies ist darauf zurückzuführen, daß der Farbstoff als Vernetzer von mehreren Polyelektrolytmolekülen fungieren kann. Der Anteil an Farbstoff in den Aggregaten sollte deswegen 10% (w/w) nicht übersteigen.

[0018] Im folgenden werden einige Ausführungsbeispiele für die Herstellung von phosphoreszierenden Polyelektrolytaggregaten gegeben.

Herstellungsvorschriften

Herstellung von phosphoreszierenden Polyelektrolytaggregaten aus Polystyrensulfonsäure und Ruthenium(II)-tris-4,7-diphenyl-1,10 phenanthrolin dichlorid

[0019] 200 ml einer 2% wässrigen Polystyrensulfonsäurelösung (MW. 150.000 Natriumsalz) werden in einem Becherglas vorgelegt. Diese Lösung wird aus einer 20% Lösung (Aldrich) durch Verdünnung hergestellt. Dann werden 100 ml eines Ethanol/Wasser Gemisches (70/30) in dem 200 mg an Ruthenium(II)-tris-4,7-diphenyl-1,10 phenanthrolin dichlorid gelöst sind unter intensiven Rühren zuge tropft. Es entsteht eine tieforange gefärbte klare Lösung. Der Ethanol wird anschließend durch Erwärmen des Lösungsgemisches in einem Wasserbad von 80°C entfernt.

[0020] Die Polyelektrolytaggregate werden anschließend durch Gefriertrocknung isoliert.

[0021] Sie werden entweder im getrockneten Zustand gelagert oder in einem wässrigen gepufferten System verwendet.

[0022] Die Quantenausbeute und die Lumineszenzlebenszeit des freien Farbstoffs in Lösung beträgt (unter luftgesättigten Bedingungen) ca. 0.05 und 700 ns. Die phosphoreszierenden Polyelektrolytaggregate sind abgeschirmt und

emittieren deswegen wesentlich intensiver mit einer Quantenausbeute von ca. 0,35 und einer Abklingzeit von 4,8 µsek. In jedem Polyelektrolytmolekül sind ca. 7–8 Farbstoffmoleküle eingebaut.

[0023] Die Anwesenheit von anionisch geladenen reduktiven Lumineszenzlöschern wie Ascorbat, Sulfit oder Oxalat, die den freien Phosphoreszenzfarbstoff vollständig löschen hat keinen Einfluß auf das Lumineszenzverhalten der Aggregate.

Herstellung von phosphoreszierenden Polyelektrolytaggregaten aus Polystyrensulfonsäure-co-maleinsäure und Ruthenium(II)-tris-4,4'-diphenyl-2,2'-bipyridyldichlorid

[0024] 200 ml einer 2% wässrigen Polystyrensulfonsäure-co-maleinsäurelösung (MW. 20.000 Natriumsalz) werden in einem Becherglas vorgelegt. Diese Lösung wird durch Lösen des festen Natriumsalzes dieses Polyelektrolyten hergestellt (Aldrich) hergestellt. Dann werden 100 ml eines Ethanol/Wasser Gemisches (70/30) in dem 400 mg an Ruthenium(II)-tris-4,4'-diphenyl-2,2'-bipyridyldichlorid gelöst sind unter intensiven Rühren zugetropft. Es entsteht eine tieforange gefärbte klare Lösung. Der Ethanol wird anschließend durch Erwärmen des Lösungsgemisches in einem Wasserbad von 80°C entfernt. Dabei kann eine leichte Trübung der Lösung auftreten. Die ausgefallenen größeren Aggregate werden durch Zentrifugation abgetrennt und verworfen. Die entstandene Lösung ist wiederum klar. Die Polyelektrolytaggregate werden aus dieser Lösung anschließend durch Gefriertrocknung isoliert. Sie werden entweder im getrockneten Zustand gelagert oder in einem wässrigen gepufferten System verwendet. Durch die Verwendung des Copolymers sind bereits reaktive Carboxylgruppen vorhanden, die zum Ankoppeln von Biomolekülen verwendet werden können.

Patentansprüche

1. Phosphoreszierende Polyelektrolytaggregate, **dadurch gekennzeichnet**, daß ein oder mehrere Moleküle eines lumineszierenden Metall-Liganden Komplexes von einem einzelnen oder mehreren Molekülen eines Polyelektrolyten umhüllt werden, diese Aggregate Lumineszenzabklingzeiten im Bereich von 100 Nanosekunden bis 10 Millisekunden aufweisen, in wässrigen Proben gelöst vorliegen und daß die Polyelektrolythülle den angeregten Zustand der Metall-Liganden Komplexe abschirmt und damit die Lumineszenzlöschung durch Bestandteile der Probe eliminiert oder zumindest abschwächt und damit die Lumineszenzeigenschaften wie Quantenausbeute, spektrales Verhalten, Lumineszenzabklingzeit und Polarisationsgrad von der jeweiligen Probenzusammensetzung weitgehend unbeeinflusst sind.
2. Phosphoreszierende Polyelektrolytaggregate nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Einbau der lumineszierenden Metall Ligand Komplexe in die umhüllenden Polyelektrolytkomplexe sowohl durch elektrostatische als auch hydrophobe Wechselwirkungen erfolgt.
3. Phosphoreszierende Polyelektrolytaggregate nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den lumineszierenden Metall-Liganden Komplexen um kationisch geladene Komplexe mit Ruthenium(II), Osmium(II) Rhodium(I), Iridium(III) Platin(II) und Palladium(II) als Zentralatom handelt.
4. Phosphoreszierende Polyelektrolytaggregate nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei

den lumineszierenden Verbindungen um Komplexe mit 2 oder 3-zähligen Polypyridylliganden wie 2,2'-Bipyridin, Bipyrazin, Phenanthrolin, Terpyridyl oder deren Abkömmlinge handelt.

5. Phosphoreszierende Polyelektrolytaggregate nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den lumineszierenden Verbindungen um die Triskomplexe des Ruthenium(II) mit 2,2'-bipyridyl, 1,10-phenanthrolin, 4,4'-diphenyl-2,2'-bipyridyl und 4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline als Liganden handelt.

6. Phosphoreszierende Polyelektrolytaggregate nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den lumineszierenden Verbindungen um Carbonylkomplexe von Re(I) mit zusätzlichen Diiminliganden wie Abkömmlinge von 2,2'-Bipyridyl und 1,10-Phenanthrolin handelt.

7. Phosphoreszierende Polyelektrolytaggregate nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den lumineszierenden Verbindungen um Porphyrine mit Pt(II) oder Pd(II) als Zentralatom handelt.

8. Phosphoreszierende Polyelektrolytaggregate nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den umhüllenden Polyelektrolytmolekülen um Homopolymere handelt, die sich durch das Vorhandensein von hydrophoben und hydrophilen Bereichen auszeichnen.

9. Phosphoreszierende Polyelektrolytaggregate nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den umhüllenden Polyelektrolytmolekülen wie Polystyrensulfonsäure, oder Polyvinylbenzoesäure handelt.

10. Phosphoreszierende Polyelektrolytaggregate nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den umhüllenden Polyelektrolytmolekülen um Copolymere bestehend aus hydrophoben Monomeren und anionisch geladenen Monomeren handelt.

11. Phosphoreszierende Polyelektrolytaggregate nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den umhüllenden Polyelektrolytmolekülen um Copolymere bestehend aus Polyacrylonitril und Polyacrylsäure handelt, wobei der Anteil an Polyacrylsäure mehr als 25% beträgt.

12. Phosphoreszierende Polyelektrolytaggregate nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den umhüllenden Polyelektrolytmolekülen um Copolymere bestehend aus einem anionisch geladenen Monomer und einem zweiten Monomer mit einer reaktiven Gruppe zum kovalente Koppeln von Biomolekülen handelt.

13. Phosphoreszierende Polyelektrolytaggregate nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den umhüllenden Polyelektrolytmolekülen um Copolymere mit Carboxyl-, Amino- oder Epoxygruppen handelt.

14. Phosphoreszierende Polyelektrolytaggregate nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den umhüllenden Polyelektrolytmolekülen vorzugsweise um ein Copolymere bestehend aus Styrensulfonsäure und Vinylbenzoesäure handelt.

15. Phosphoreszierende Polyelektrolytaggregate nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem umhüllenden Polyelektrolytmolekülen um kationisch geladene Polyelektrolytmoleküle handelt.

16. Verfahren zur Herstellung von phosphoreszierenden Polyelektrolytaggregaten nach Anspruch 1 wobei die Aggregate durch Mischen einer wässrigen Polyelektrolytlösung und einer Metall-Ligand-Komplex Lösung hergestellt werden.

17. Verfahren zur Herstellung von phosphoreszierenden

den Polyelektrolytaggregaten nach Anspruch 1 wobei das Lösungsmittel der Metall-Ligand-Komplex Lösung mit Wasser mischbar ist und vorzugsweise Wasser, Ethanol, Methanol oder Aceton ist.

18. Verwendung der phosphoreszierenden Polyelektrolytaggregate nach den Ansprüchen 1–15 zur Markierung und zum Nachweis von Molekülen insbesondere von Biomolekülen aus der Gruppe der Toxine, Hormone, Hormonrezeptoren, Peptide, Proteine, Lektine, Oligonukleotide, Antikörper, Antigene, Viren und Bakterien. 5 10

19. Verwendung der phosphoreszierenden Polyelektrolytaggregate nach den Ansprüchen 1–15 zum Nachweis von Molekülen insbesondere von Biomolekülen aus der Gruppe der Toxine, Hormone, Hormonrezeptoren, Peptide, Proteine, Lektine, Oligonukleotide, Antikörper, Antigene, Viren und Bakterien 15

20. Verwendung der phosphoreszierenden Polyelektrolytaggregate nach den Ansprüchen 1–15 als Referenzstandards zur Referenzierung von Fluoreszenzintensitätssignalen von fluorimetrischen Assays. 20

21. Verwendung der phosphoreszierenden Polyelektrolytaggregate nach den Ansprüchen 1–15 zur Referenzierung von Fluoreszenzintensitätsassays wobei durch die Zugabe des Referenzstandards zur Probe die Information der Fluoreszenzintensität in ein Phasensignal oder einen zeitabhängigen Parameter umgewandelt wird. 25

22. Verwendung der phosphoreszierenden Polyelektrolytaggregate nach den Ansprüchen 1–15 zur Referenzierung des Fluoreszenzintensitätssignals von optischen Fluoreszenzsensoren wobei die phosphoreszierenden Polyelektrolytaggregate mit dem Fluoreszenzindikator in einer festen Phase gemeinsam immobilisiert werden. 30 35

23. Verwendung der phosphoreszierenden Polyelektrolytaggregate nach den Ansprüchen 1–15 für Lumineszenzbindungsassays auf der Basis strahlungslosen Energietransfers, zum Nachweis von Proteinen, Antigen, Viren, Mikroorganismen, DNA- und RNA-Fragmenten sowie Oligonukleotiden, dadurch gekennzeichnet, daß der eingebaute Phosphoreszenzfarbstoff als Donor fungiert. 40

24. Verwendung der phosphoreszierenden Polyelektrolytaggregate nach den Ansprüchen 1–15 als hochempfindliche Sonde für hydrogeologische Strömungsuntersuchungen. 45

25. Phosphoreszierende Polyelektrolytaggregate, dadurch gekennzeichnet, daß ein oder mehrere Moleküle eines lumineszieren Metall-Liganden Komplexes von einem einzelnen oder mehreren Molekülen eines Polyelektrolyten umhüllt werden, diese Aggregate Lumineszenzabklingzeiten im Bereich von 100 Nanosekunden bis 10 Millisekunden aufweisen, in wässrigen Proben gelöst vorliegen und daß die Polyelektrolythülle den angeregten Zustand der Metall-Liganden Komplexe abschirmt und damit die Lumineszenzlöschung durch viele Bestandteile der Probe eliminiert oder zumindest abschwächt, aber die Lumineszenzlöschung durch molekularen Sauerstoff zu mindest teilweise erhalten bleibt. 50 55 60

26. Verwendung der phosphoreszierenden Polyelektrolytaggregate nach den Anspruch 25 zur quantitativen Bestimmung des Gelöstsauerstoffs in wässrigen Medien. 65

Abbildung 1.

